MycAssay™ Aspergillus
Cepheid SmartCycler®
Serum
REF 080-045

Vorgesehener Verwendungszweck

MycAssay™ Aspergillus ist vorgesehen für die Verwendung durch qualifiziertes Laborfachpersonal zum qualitativen Nachweis von aus Serum extrahierter, genomischer DNA von *Aspergillus* spp. im Rahmen der Abklärung der Diagnose einer pulmonalen Aspergillose.

MycAssay™ Aspergillus (SERUM) wurde für den Gebrauch mit dem Cepheid SmartCycler® Real-Time-PCR-System (mit der Dx-Software, Version 1.7b und 3.0) validiert.

Informationen zum Test

Aspergillus spp. sind allgegenwärtige, opportunistische Fadenpilze, die sowohl allergische als auch invasive Erkrankungen (Syndrome) auslösen. Die Gattung umfasst annähernd 300 Spezies, von denen 41 mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden sind. Die überwiegende Anzahl der Krankheiten wird durch *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* und *A. niger* verursacht; seltener sind *A. nidulans* und andere seltene Spezies wie *A. sydowii, A. versicolor, A. lentulus* und *A. pseudofischeri* am Krankheitsgeschehen beteiligt.[1] Die meisten Krankheiten, die durch *Aspergillus* spp. verursacht werden, betreffen den Respirationstrakt. Die invasive Aspergillose (IA) kommt in Risikopatientengruppen vor, einschließlich derjenigen, die aufgrund einer Leukämie oder eines Lymphoms behandelt werden, Patienten nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (HSCT) und nach Organtransplantation sowie Patienten, die mit Kortikosteroiden behandelt werden, und solchen mit Neutropenie oder einer Phagozytendysfunktion (d. h. einer septischen Granulomatose und mit HIV-Infektion).

Die Raten invasiver Pilzinfektionen (IFI) sind bei Patienten, die eine allogene HSCT erhalten haben, nahezu siebenmal höher als bei Patienten mit autologen Transplantaten, wobei die invasive Aspergillose (IA) für ca. die Hälfte der Infektionen verantwortlich ist[2]. Die Aspergillose beschränkt sich bei Patienten mit autologer HSCT im Wesentlichen auf die frühe neutropenische Phase nach der Transplantation. Patienten mit allogener HSCT sind erheblich länger gefährdet, nicht nur die ersten 100 Tage, sondern auch darüber hinaus, was auf die häufiger auftretende Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR) und die langsame Wiederherstellung der T-Zellen zurückzuführen ist. Bei Patienten, die eine Chemotherapie aufgrund akuter Leukämie oder eine Salvage-Therapie bei rezidivierender Leukämie oder rezidivierendem Lymphom erhalten, ist die IA eine Haupt-Todesursache.

Die Konsensusdefinitionen invasiver Pilzinfektionen wurden von der Europäischen Organisation für Krebsforschung und –behandlung (EORTC) und der Mykoses Study Group (MSG) überarbeitet und herausgegeben. Sie umfassen definierte Kriterien für die Diagnose einer nachgewiesenen, wahrscheinlichen und möglichen IA bei Patienten mit hämatologischen Malignomen oder nach HSCT[3]. Derzeit sind die Kriterien für eine „wahrscheinliche IA" als ein Host-Faktor plus ein klinisches Kriterium plus ein mikrobiologischer Test definiert. Für die Diagnose einer „möglichen IA" ist kein mikrobiologisches Kriterium erforderlich. Zu den mikrobiologischen Tests, die in den Kriterien für eine wahrscheinliche IA anerkannt sind, zählt ein Serum-basierter ELISA-Test, der die Anwesenheit von Galactomannan nachweist. Galactomannane sind Polysaccharide, die beim Wachstum des Pilzes *Aspergillus* freigesetzt werden. Im Serum besitzt der Test eine Sensitivität von 79,3 % (95%-VI 61,6-90,2%) und eine Spezifität von 88,8% (95%-VI 82,6-93,0) bei erwachsenen Patienten, die nicht prophylaktisch mit gegen Fadenpilze wirksamen Azolen behandelt werden[4]. Zur Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit werden zwei aufeinanderfolgende positive GM-Tests empfohlen.

In einer Meta-Analyse werteten Mengoli et al. >10.000 Blut-, Serum- und Plasma-Proben von 1.618 Patienten mit IA-Risiko aus. Sie berechneten die Sensitivität einer einzigen PCR-positiven Blutprobe auf 0,88 (95%-VI 0,75-0,94) und

[1] Spezies-Datenbank unter www.aspergillus.org.uk
[2] Kontoyiannis DP et al. Clin Infect Dis 2010: 50(8); 1091-1100
[3] Ascioglu S et al. Clin Infect Dis 2002: 34; 7-14
[4] BioRad Platelia *Aspergillus* EIA Produktinformation

deren Spezifität auf 0,75 (95%-VI 0,63-0,84) und die diagnostische Odds Ratio für nachgewiesene und wahrscheinliche Fälle auf 16,41 (95%-VI 6,43 – 41,88)[5].

MycAssay™ Aspergillus ist ein molekulardiagnostischer Kit für den Nachweis genomischer DNA von *Aspergillus* spp. mithilfe der Molecular-Beacon-Real-Time-PCR-Technologie.[6] Der gesamte Test kann – inklusive der DNA-Extraktion aus der klinischen Probe – innerhalb von 4 Stunden durchgeführt werden. Im Vergleich dazu werden für Pilzkulturen mehrere Tage benötigt, um einen positiven Befund zu erhalten. Dieser Assay bietet Vorteile gegenüber den gegenwärtig verfügbaren diagnostischen Verfahren für die akut invasive und die chronisch-pulmonale Aspergillose. Zu diesen Vorteile zählen ein schnellerer Nachweis von *Aspergillus* spp. und das Potential einer gesteigerten Sensitivität für *Aspergillus* spp. in stark abwehrgeschwächten Patienten, die im Verdacht stehen, eine invasive pulmonale Aspergillose zu haben.

Testprinzip

Nach dem Mischen der Reagenzien des MycAssay™ Aspergillus-Kits mit einer Probe, die die *Aspergillus*-DNA-Zielsequenz (ein Abschnitt des ribosomalen 18S-Gens von *Aspergillus*) enthält, erfolgt die DNA-Amplifikation im Thermocycler. Der Assay enthält außerdem eine interne Amplifikations-Kontrolle (IAC) – ein DNA-Fragment, das weder in *Aspergillus* spp. noch in anderen Pilz- oder Bakteriengenomen und auch nicht im menschlichen Genom vorkommt –, um inhibitorische Substanzen im PCR-Ansatz nachzuweisen und die Funktionalität der Assay-Reagenzien zu bestätigen.

Die amplifizierten DNA-Zielsequenzen werden mithilfe der Molecular-Beacon-Technologie nachgewiesen. Molecular Beacons sind einzelsträngige Oligonukleotid-Hybridisierungssonden, die eine Stamm-Schleifen-Struktur (engl. stem-and-loop structure) bilden. Die Schleife enthält eine zu einer Zielsequenz komplementäre Sondensequenz und der Stamm (Sequenzstrang) wird durch die Anlagerung der komplementären Armsequenzen gebildet, die an jeder Seite der Sondensequenz lokalisiert sind. Das Ende des einen Arms ist kovalent mit einem Fluorophor, der bei Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge fluoresziert, verbunden, während das Ende des anderen Arms – ebenfalls über eine kovalente Bindung – ein Quencher-Molekül trägt, das die Fluoreszenz des Fluorophors unterdrückt, solange es sich in unmittelbarer Nähe befindet. Die Molecular Beacons fluoreszieren nicht, wenn sie frei in der Lösung vorliegen. Wenn sie jedoch mit einem Nukleinsäurestrang hybridisieren, der eine Zielsequenz enthält, erfolgt eine Konformationsänderung, durch die Fluorophor und Quencher voneinander getrennt werden, sodass es nach Anregung zur Fluoreszenz kommt. Der Umfang der Fluoreszenz, d. h, die Intensität des Signals, in irgendeinem bestimmten Zyklus, oder nach der Beendigung der Zyklen, hängt von der Menge der spezifischen Amplicons ab, die zu diesem Zeitpunkt vorhanden sind. Das Real-Time-PCR-System detektiert in Echtzeit die von jedem Beacon emittierte Fluoreszenz.

Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Kit darf nur von Laborfachpersonal verwendet werden. Es werden Testverfahren für die aerosolfreie Handhabung der Proben benötigt. Die Standard-Vorsichtsmaßnahmen und die Labor-Richtlinien sollten bei der Bearbeitung sämtlicher Proben beachtet werden. Ein Material-Sicherheitsdatenblatt kann von Myconostica Ltd. bezogen werden.

- Dieser Test ist nur für den *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch vorgesehen.
- In analytischen Validierungsstudien wurde gezeigt, dass Transaminase-Spiegel von 22,2 U pro 0,5 ml Serum möglicherweise einen Abbau der *Aspergillus*-DNA bewirken.
- Dieser Assay wurde mit Serum, das mithilfe von Greiner Serumröhrchen (rote Kappe) entnommen wurde, evaluiert. Andere Serum-/Blutentnahmeröhrchen enthalten möglicherweise inhibierende oder konkurrierende Substanzen, die nicht geprüft wurden.
- Dieser Assay wurde für Serumproben validiert. Für Plasma oder Vollblut liegen keine Validierungsdaten vor.
- Dieser Test ist nur für den Gebrauch mit dem Cepheid SmartCycler® System und der Dx-Diagnostik-Software, Versionen 1.7b und 3.0, vorgesehen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien oder Kontrollen, deren Schutzbeutel bei der Lieferung geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien und Kontrollen können nicht zwischen Kits mit unterschiedlichen Chargennummern ausgetauscht werden.
- Niemals Reagenzien oder Kontrollen aus unterschiedlichen Röhrchen vereinigen, selbst wenn sie aus derselben Charge stammen.
- Verwenden Sie Reagenzien oder Kontrollen niemals nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Stellen Sie sicher, dass alle verwendeten Reagenzien frei von Verunreinigungen durch Pilze sind.
- Nach dem Öffnen sollten die Reagenzien und Kontrollen nicht wieder eingefroren oder wiederverwendet werden.
- Beim Umgang mit den Reagenzien des Kits sind Schutzkleidung und Einmal-Handschuhe zu tragen.

[5] Mengoli C. et al. The Lancet ID 2009: 9; 86-96
[6] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

- Mikrobielle Kontamination oder Kontamination der Reagenzien durch Desoxyribonuklease (DNAse) während der Entnahme von Aliquoten vermeiden.
- Die Verwendung von sterilen, DNAse-freien Low-Retention-Einmal-Filterpipettenspitzen oder Pipettenspitzen für Positive-Displacement-Pipetten wird empfohlen.
- Benutzen Sie für jede Probe und jedes Reagenz eine neue Pipettenspitze.
- Entsorgen Sie ungebrauchte Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Bundes-, Landes- oder örtlichen Vorschriften.
- Zur Vermeidung von Kontaminationen mit *Aspergillus*- oder IAC-Amplicons sollten die Reaktionsgefäße nach der Amplifikation nicht mehr geöffnet werden.
- Das Testen zusätzlicher Kontrollen kann gemäß den Richtlinien oder Bestimmungen von örtlichen, Landes- und/oder Bundesbehörden oder akkreditierenden Organisationen erforderlich sein.
- In Arbeitsbereichen, in denen mit Proben oder Kit-Reagenzien gearbeitet wird, darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Serum darf bis zu 48 h in einem Kühlschrank (2 bis 8 °C) oder Tiefkühlschrank (-15 bis -25 °C) gelagert werden.
- Lösungen mit einer niedrigen DNA-Konzentration können bei unsachgemäßer Lagerung instabil sein. Es wird empfohlen, die aus klinischen Proben extrahierte DNA bei -80 °C zu lagern, um die DNA-Integrität zu erhalten. Wenn möglich, sollte wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren vermieden werden.

Kit-Inhalt

Beschreibung

Der Kit enthält fünf Folienbeutel mit jeweils drei verschlossenen Kompartimenten; die Beutel können einzeln aus der Schachtel entnommen und separat verwendet werden. Jeder Beutel enthält genug Reagenzien für acht Reaktionen.

		Volumen
Röhrchen 1 (oranger Deckel)	dNTPs $MgCl_2$ Gepufferte Lösung mit DNA-Polymerasekomplex	66 µL
Röhrchen 2 (grüner Deckel)	< 0,01 % Primer < 0,01 % Molecular Beacons < 0,0001 % interne Amplifikationskontrolle (IAC) Die interne Amplifikationskontrolle ist ein rekombinantes DNA-Plasmid, das eine nicht-infektiöse Sequenz enthält, die mit keiner *Aspergillus*-Zielsequenz übereinstimmt. Tris-HCl Puffer	66 µL
Röhrchen 3 (farbloser Deckel)	Negativkontrolle Wasser	25 µL
Röhrchen 4 (schwarzer Deckel)	Positivkontrolle < 0,0001 % Positivkontroll-DNA Die Positivkontroll-DNA ist ein rekombinantes Plasmid, das die *Aspergillus*-Zielsequenz enthält. Tris-HCl Puffer	25 µL

Der Kit enthält außerdem:

- Myconostica Protokoll-CD-ROM für den MycAssay™ Aspergillus-Test
- Gebrauchsanweisung
- Analysenzertifikat

Aufbewahrung

Der Kit sollte bis zum Verfallsdatum, das auf dem Etikett der Schachtel angegeben ist, eingefroren (-15 bis -25 °C) gelagert werden. Danach sollte er gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Nach Öffnen eines Beutels muss dessen Inhalt sofort verwendet werden; die Reagenzien dürfen nicht erneut eingefroren oder wiederverwendet werden.

Vom Anwender bereitzustellende Geräte und Materialien

A. Zusätzlich benötigte Laborgeräte
   - SmartCycler® Real-Time-PCR-System (einschließlich Benutzerhandbuch, angeschlossenem
   - Computer und SmartCycler® Dx Software, Version 3.0 oder 1.7b)
   - SmartCycler® Reaktionsgefäße
   - Mini-Zentrifuge mit passendem Adapter für SmartCycler® Reaktionsgefäße
   - Ständer (aus Kunststoff) für SmartCycler® Reaktionsgefäße

B. Allgemeine Laborgeräte/-materialien, die zusätzlich benötigt werden
   - Mikrozentrifuge
   - Laborschüttler (Vortex)
   - Mikroliter-Pipetten (Volumenbereich: 7,5–20 µL)
   - Sterile Low-Retention-Filter-Pipettenspitzen
   - Einmal-Handschuhe, puderfrei
   - Anwendereigene DNA-Dekontaminationslösung
   - Permanent-Markerstift (für wasserfeste Beschriftung)
   - DNA-Extraktions-Kit (siehe unten)

Probe

Als Ausgangsprobe für den MycAssay™ Aspergillus Assay wird genomische Gesamt-DNA verwendet, die aus Serumproben extrahiert wurde. Für diesen Zweck werden der im Folgenden genannte DNA-Extraktions-Kit sowie die folgenden Laborgeräte, die auch zur Validierung verwendet wurden, empfohlen:

- Manueller High Pure DNA-Extraktionskit (Roche Diagnostics, Kat.-Nr. 11 796 828 001)
- Proteinase-K-Lösung (Sigma Aldrich Chemicals, Kat.-Nr. P4850-5ML)
- 2-Propanol (Sigma Aldrich Chemicals, Kat.-Nr. 19516-25ML)
- Laborschüttler Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Adapterplatte für Vortex-Laborschüttler (REF-Nr.: 080-015, bei Myconostica erhältlich)

Hinweise zur Durchführung

Lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Durchführung beginnen.

- Die Durchführung des MycAssay™ Aspergillus-Tests dauert (einschließlich DNA-Extraktion) ungefähr 2½ Stunden, je nach Anzahl der zu analysierenden Proben.
- Das Ansetzen der Reaktionen für den Test sollte in einer PCR-Workstation oder in einem Labor, das räumlich vom PCR-Labor getrennt ist, durchgeführt werden. Falls eine PCR-Workstation nicht zur Verfügung steht, sollte das Ansetzen der Reaktionen in einem für PCR geeigneten Bereich des Labors[7], der räumlich getrennt ist von den Bereichen, die für DNA-Extraktionen genutzt werden, und der regelmäßig mit DNA-Dekontaminations-Reagenzien gereinigt wird, erfolgen.
- Während des Ansetzens der Real-Time-PCR-Reaktionen sollten Sie keine DNA-Dekontaminationslösungen verwenden, da dies die Reaktionen inhibieren könnte.
- Verwenden Sie Mikroliter-Pipetten für den Transfer von Flüssigkeiten. Für das Ansetzen der Reaktionen sollten separate Mikroliter-Pipetten verwendet werden, die regelmäßig dekontaminiert werden sollten.
- Es wird empfohlen, Low-Retention-Filter-Pipettenspitzen zu verwenden, um sicherzustellen, dass während des PCR-Setup keine DNA durch Anhaftungen verloren geht.
- **Mit Röhrchen Nr. 4 sollten Sie besonders vorsichtig umgehen. Es enthält Positivkontroll-DNA-Material und eine Kontamination könnte falsch-positive Testergebnisse verursachen.**
- Tragen Sie während der gesamten Prozedur Einmal-Laborhandschuhe.
- Alle Reagenzienröhrchen müssen nach Gebrauch und vor der Entsorgung mit dem zugehörigen Deckel verschlossen werden.

[7] Siehe beispielsweise Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

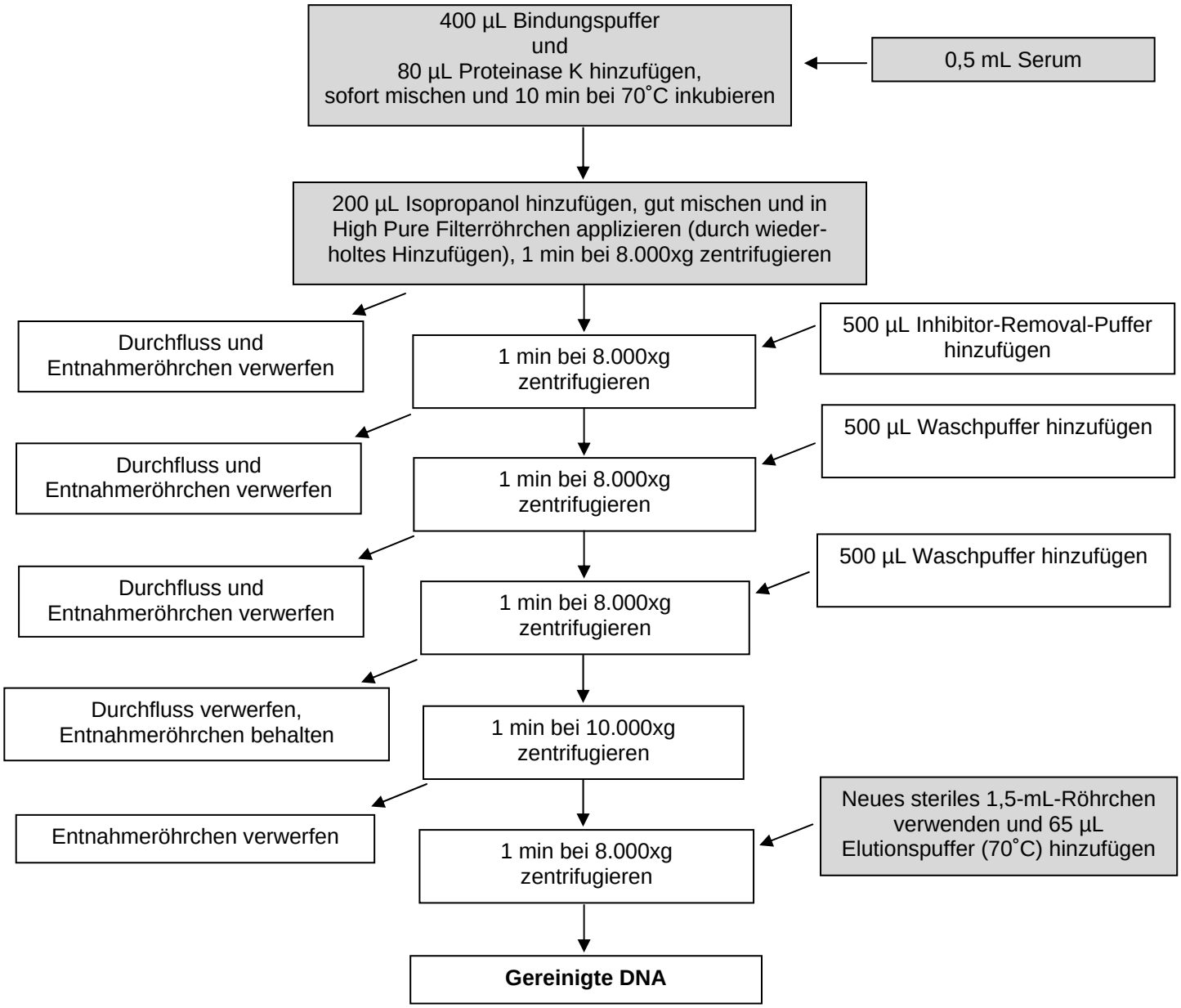
- Achten Sie darauf, dass alle SmartCycler® Reaktionsgefäße ordnungsgemäß beschriftet sind, wenn mehrere Patientenproben verarbeitet werden.
- Achten Sie bei der Auswahl der Laufdatei für das Protokoll aus das Folgende: Wählen Sie **SERUM MycAssay Asp v1**. Wählen Sie NICHT **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3** oder **MycAssay Aspergillus v1_3**.

Testdurchführung

Das Verfahren besteht aus zwei Phasen – der DNA-Extraktion aus Serum, gefolgt von der Real-Time-PCR-Quantifizierung. Die DNA-Extraktion wird mithilfe des Roche High Pure PCR-Templat-Vorbereitungskits vorgenommen. Das High Pure PCR-Template-Vorbereitungskit wurde für die Reinigung von Nukleinsäuren aus verschiedenen Probentypen entwickelt. Das in dieser Gebrauchsanweisung angegebene Extraktionsprotokoll wurde für die Isolierung von DNA der *Aspergillus* spp. aus Serum optimiert und ist zur Verwendung mit dem MycAssay™ Aspergillus Serum-Kit geeignet.

WICHTIGER HINWEIS: Die Anweisungen des Herstellers wurden modifiziert, um die DNA-Ausbeute aus einer Serumprobe sowie die Sensitivität des Tests zu verbessern. Bestimmte Reagenzien, die in den Schritten 1 und 2 von Abschnitt 2.3 der Gebrauchsanweisung des High Pure PCR-Template-Vorbereitungskits angegeben sind, werden vor anderen aufgebraucht sein und müssen ersetzt werden. Während des Validierungsverfahrens wurde Proteinase K von Sigma Aldrich verwendet.

Extraktionsprotokoll – grau unterlegte Bereiche kennzeichnen die Schritte, die gegenüber den Herstelleranweisungen modifiziert wurden.


400 µL Bindungspuffer und 80 µL Proteinase K hinzufügen, sofort mischen und 10 min bei 70˚C inkubieren
0,5 mL Serum
200 µL Isopropanol hinzufügen, gut mischen und in High Pure Filterröhrchen applizieren (durch wiederholtes Hinzufügen), 1 min bei 8.000xg zentrifugieren
Durchfluss und Entnahmeröhrchen verwerfen
1 min bei 8.000xg zentrifugieren
500 µL Inhibitor-Removal-Puffer hinzufügen
Durchfluss und Entnahmeröhrchen verwerfen
1 min bei 8.000xg zentrifugieren
500 µL Waschpuffer hinzufügen
Durchfluss und Entnahmeröhrchen verwerfen
1 min bei 8.000xg zentrifugieren
500 µL Waschpuffer hinzufügen
Durchfluss verwerfen, Entnahmeröhrchen behalten
1 min bei 10.000xg zentrifugieren
Entnahmeröhrchen verwerfen
1 min bei 8.000xg zentrifugieren
Neues steriles 1,5-mL-Röhrchen verwenden und 65 µL Elutionspuffer (70˚C) hinzufügen
Gereinigte DNA

1. Ansetzen der Real-Time-PCR

1.1 Schalten Sie das Real-Time-PCR-System (Gerät und zugehörigen Computer) ein und starten Sie die zugehörige Software. Geben Sie, falls erforderlich, Nutzernamen und Passwort ein.

1.2 Stellen Sie sicher, dass der Arbeitsbereich mit DNA-Dekontaminationslösung gereinigt und vollständig trocken ist; vermeiden Sie während des Ansetzens der Reaktionen die Verwendung dieser Lösung, da sie die PCR-Reaktionen inhibieren könnte.

1.3 Ein Beutel enthält jeweils eines der Röhrchen 1, 2, 3 und 4. Die Reagenzien in einem Beutel reichen für die Durchführung von acht Reaktionen. Mindestens eine Positivkontroll-Reaktion und eine Negativkontroll-Reaktion müssen pro Lauf mit durchgeführt werden, wobei die Reagenzien aus einer einzigen Kit-Charge stammen müssen. Daher können 6 Patientenproben mit einer Packung analysiert werden. Falls mehr als sechs Proben untersucht werden müssen, können mehrere Beutel verwendet werden, wobei die verwendeten Beutel aus derselben Kit-Charge stammen müssen. Maximal können 38 Patientenproben mit den fünf Beuteln eines Kits analysiert werden.

1.4 Berechnen Sie unter Berücksichtigung der folgenden Tabelle die Anzahl der benötigten Reaktionsansätze:

Anzahl Beutel	Maximale Anzahl an Patientenproben
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

1.5 Nehmen Sie die entsprechende Anzahl der Beutel aus dem Tiefkühlschrank. Einen Beutel, der nicht mehr dicht verschlossen ist, sollten Sie nicht verwenden. Falls die aus den Patientenproben gewonnenen DNA-Proben nach der Extraktion eingefroren wurden, entnehmen Sie auch sie aus dem Tiefkühlschrank.

1.6 Öffnen Sie die benötigte Anzahl an Beuteln und entnehmen Sie die Röhrchen. Wenn insgesamt mehrere Reagenzienbeutel für eine Analyse benötigt werden, aber nur ein Satz Positiv- und Negativkontrollen, dann brauchen Sie die Röhrchen 3 und 4 nur aus einem der Beutel zu entnehmen. **Mit Röhrchen Nr. 4 sollten Sie besonders vorsichtig umgehen. Es enthält Positivkontroll-DNA-Material und eine Kontamination könnte falsch-positive Testergebnisse verursachen.**

1.7 Lassen Sie die Röhrchen für 5–10 Minuten bei Raumtemperatur auftauen; vergewissern Sie sich, dass der Inhalt jedes Röhrchens vollständig aufgetaut ist, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren. Mischen Sie den Inhalt der Röhrchen und die Patientenproben kurz auf einem Laborschüttler (Vortex). Zentrifugieren Sie anschließend kurz in einer Mikrozentrifuge, um den gesamten Inhalt vor Gebrauch vollständig am Boden der Röhrchen zu sammeln.

1.8 Setzen Sie die benötigte Anzahl SmartCycler® Reaktionsgefäße in den oder die Ständer. Achten Sie darauf, dass Sie nur den Schaft der Reaktionsgefäße mit Ihren Händen berühren.

1.9 Pipettieren Sie die Negativkontrolle immer zuerst, danach die Patientenproben. Als Letztes sollte immer die Positivkontrolle hinzugegeben werden.

1.10 Die zu pipettierenden Volumina der Reagenzien und DNA-Lösungen bzw. Proben sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Reagenz	Reaktion		
	Negativkontrolle	**Patientenprobe**	**Positivkontrolle**
Röhrchen 1 (oranger Deckel)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Röhrchen 2 (grüner Deckel)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Röhrchen 3 (farbloser Deckel)	10 µL	-	-
Patientenprobe	-	10 µL	-
Röhrchen 4 (schwarzer Deckel)	-	-	10 µL
Gesamtvolumen	25 µL	25 µL	25 µL

1.11 Pipettieren Sie die Reagenzien in derselben Reihenfolge, wie sie in obiger Tabelle aufgelistet sind: Röhrchen 1, dann Röhrchen 2, anschließend die Template-DNA (Negativkontrolle, Patientenprobe oder Positivkontrolle). Entnehmen Sie die Aliquote aus Röhrchen 1 vorsichtig; die Flüssigkeit ist etwas viskos und kann eventuell an der

inneren Kante des Röhrchens anhaften. Falls dies geschieht, zentrifugieren Sie nochmals kurz, um den Inhalt vollständig am Boden des Röhrchens zu sammeln, bevor Sie erneut versuchen, das gesamte Aliquot zu entnehmen.

1.12 Benutzen Sie für jeden Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze. Verschließen Sie nach Gebrauch jedes Röhrchen wieder und entsorgen Sie es – mitsamt dem eventuell verbliebenen restlichen Inhalt – unverzüglich in einen verschließbaren Behälter für klinische Abfälle. Nicht gebrauchte Reagenzien können nicht für spätere Verwendung aufbewahrt werden.

1.13 Seien Sie beim Pipettieren der Positivkontroll-DNA (Röhrchen 4) besonders vorsichtig und stellen Sie sicher, dass kein anderes Röhrchen oder Reaktionsgefäß damit kontaminiert wird. Verschließen Sie die Deckel der anderen Röhrchen bzw. Reaktionsgefäße, bevor Sie Röhrchen 4 öffnen; dies trägt dazu bei, das Risiko von Kreuzkontaminationen zu reduzieren.

1.14 Vergewissern Sie sich, dass die Deckel aller SmartCycler® Reaktionsgefäße fest verschlossen sind, und beschriften Sie jeden Deckel mit einem Permanent-Markerstift, z. B. mit „POS“ (für Positivkontrolle), „NEG“ (für Negativkontrolle) und mit einer Kenn-Nr. bei den Patientenproben. Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße für 10 Sekunden in einer Mikrozentrifuge mit passendem Adapter, um den gesamten Inhalt vor Gebrauch am Boden der Röhrchen zu sammeln. Überzeugen Sie sich durch visuelle Kontrolle, dass keine Blasen in den Reaktionsansätzen vorhanden sind.

1.15 Fahren Sie unverzüglich mit Abschnitt 2 fort. Die angesetzten MycAssay™ Reaktionen zum Nachweis von Aspergillus sind für bis zu 60 Minuten stabil.

1.16 Stellen Sie sicher, dass der gesamte Arbeitsbereich im Anschluss an das PCR-Setup gründlich mit DNA-Dekontaminationslösung gereinigt wird.

2. Durchführung des Laufs

Bevor Sie mit dem folgenden Abschnitt fortfahren, vergewissern Sie sich bitte, welche Version der Dx-Software auf Ihrem Computer installiert ist. Öffnen Sie die Software, wählen Sie in der Werkzeugleiste die Option Help und klicken Sie auf About.

Bei Version 1.7b befolgen Sie die Anweisungen im folgenden Abschnitt 2.1.
Bei Version 3.0 befolgen Sie die Anweisungen im Abschnitt 2.2.

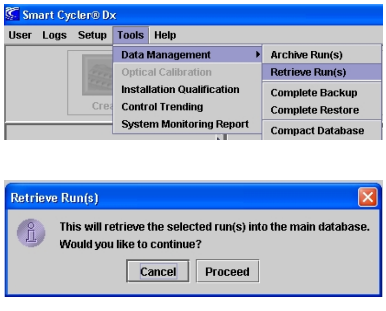
Beachten Sie bitte auch, dass bestimmte Benutzerrechte erforderlich sind, um einen Lauf abzurufen (**Retrieve Run(s)**) oder einen Assay zu importieren (**Import**). Diese Rechte können nur vom **Administrator** des Geräts vergeben werden.

SmartCycler® Dx-Diagnostik-Software, Version 1.7b

2.1.1 Öffnen Sie die SmartCycler® Dx-Diagnostik-Software (Version 1.7b) und geben Sie Nutzernamen und Passwort ein.

2.1.2 Legen Sie die **MycAssay Aspergillus-Protokoll-CD-ROM** von **Myconostica** in das Laufwerk ein und klicken Sie auf die Registerkarte **Define Assays**.

2.1.3 Gehen Sie im **Tools**-Verzeichnis in der Menüleiste am oberen Bildschirmrand auf die Funktion **Retrieve Run(s)** und klicken Sie dann auf **Proceed**:



2.1.4 Wählen Sie die Datei **SERUM MycAssay Asp v1.DXA** auf der CD-ROM. WARNUNG: Diese Datei ist eine von zweien, die von der Software erkannt werden. Stellen Sie sicher, dass Sie die korrekte Datei auswählen.

2.1.5 Markieren Sie im nächsten Dialogfenster den Dateinamen **SERUM MycAssay Asp. v1** und klicken Sie auf **OK**, im anschließenden Dialogfenster auf **Proceed** und noch einmal auf **OK**.

2.1.6 Schließen Sie die Software. Beim nächsten Öffnen der Software kann der Assay **SERUM MycAssay Asp v1** beim Anlegen eines neuen Laufs verwendet werden.

2.1.7 Klicken Sie auf den Reiter der Registerkarte **Create Run**. Geben Sie einen geeigneten Laufnamen (**Run Name**) ein (es wird empfohlen, dass der Name zumindest das Datum und die Initialen des Benutzers enthält). Sie können dieses Eingabefeld auch freilassen, wenn Sie möchten, dass der Name automatisch von der Software vergeben wird.

2.1.8 Wählen Sie **SERUM MycAssay Asp v1** als Assay.

2.1.9 Geben Sie Chargennummer (**Lot Number**) und Verfallsdatum (**Expiration Date**) des Kits ein, so wie sie auf der Kit-Schachtel und auf den Reagenzienbeuteln angegeben sind. Die Chargennummer hat das Format M-XXXXXXXX.

2.1.10 Geben Sie die Anzahl der Proben (**Number of specimens**) in das entsprechende Feld ein und klicken Sie auf **Apply**. Als Proben-Kennung (**Sample ID**) erhält jede Probe von der Software automatisch die Bezeichnung **SPEC**. Für eine eindeutige Probenidentifizierung sollten Sie daher jede Position entsprechend umbenennen; klicken Sie dazu auf **SPEC**, um den Eintrag zu markieren und tippen Sie die Proben-Kennung ein.
Die Software fügt automatisch eine Negativ- und eine Positivkontrolle im Real-Time-PCR-Lauf ein.

2.1.11 Setzen Sie die Reaktionsgefäße sorgfältig in die vorgesehenen Positionen des SmartCycler® Thermoblocks und klicken Sie auf **Start Run**. Anmerkung: Achten Sie darauf, dass Sie die Reaktionsgefäße in die richtigen Positionen setzen, da sie eventuell nicht in derselben Reihenfolge sind wie beim Ansetzen der Reaktionen. Notieren Sie den Laufnamen und klicken Sie auf **OK**. Daraufhin startet der Analysenlauf; während des Laufs wird die jeweils bearbeitete Probe durch ein rotes Signal im Block angezeigt.

2.1.12 Zur Abfrage, wie lange es noch bis zum Ende des Laufs dauert, klicken Sie auf die Registerkarte **Check Status**. Der Laufname und die noch verbleibende Laufzeit werden angezeigt.

2.2 SmartCycler® Dx-Diagnostik-Software, Version 3.0

2.2.1 Öffnen Sie die SmartCycler® Dx-Diagnostik-Software (Version 3.0) und geben Sie Nutzernamen und Passwort ein.

2.2.2 Legen Sie die **MycAssay Aspergillus Protokoll-CD-ROM** von **Myconostica** in das Laufwerk ein und klicken Sie auf die Registerkarte **Define Assays**; klicken Sie auf **Import**, um die Datei **SERUM MycAssay Asp v1.sca** von der CD-ROM zu importieren. WARNUNG: Diese Datei ist eine von zweien, die von der Software erkannt werden. Stellen Sie sicher, dass Sie die korrekte Datei auswählen.

2.2.3 Klicken Sie auf den Reiter der Registerkarte **Create Run**. Geben Sie einen geeigneten Laufnamen (**Run Name**) ein (es wird empfohlen, dass der Name zumindest das Datum und die Initialen des Benutzers enthält). Sie können dieses Eingabefeld auch freilassen, wenn Sie möchten, dass der Name automatisch von der Software vergeben wird.

2.2.4 Wählen Sie **SERUM MycAssay Asp v1** als Assay.

2.2.5 Geben Sie Chargennummer (**Lot Number**) und Verfallsdatum (**Expiration Date**) des Kits ein, so wie sie auf der Kit-Schachtel und auf jedem Reagenzienbeutel angegeben sind. Die Chargennummer hat das Format M-XXXXXXXX.

2.2.6 Geben Sie die Patienten-/Proben-Kennung und die Anzahl der Proben (Mehrfachbestimmungen pro Probe) in den entsprechenden Eingabefeldern (**Patient (Sample) ID** bzw. **Number of specimens**) ein und klicken Sie auf **Apply**. Geben Sie diese Daten für alle zu analysierenden Patientenproben ein. Die Software fügt automatisch eine Negativ- und eine Positivkontrolle im Real-Time-PCR-Lauf ein.

2.2.7 Setzen Sie die Reaktionsgefäße sorgfältig in die vorgesehenen Positionen des SmartCycler® Thermoblocks und klicken Sie auf **Start Run**. Anmerkung: Achten Sie darauf, dass Sie die Reaktionsgefäße in die richtigen Positionen setzen, da sie eventuell nicht in derselben Reihenfolge sind wie beim Ansetzen der Reaktionen. Notieren Sie den Laufnamen und klicken Sie auf **OK**. Daraufhin startet der Analysenlauf; während des Laufs wird die jeweils bearbeitete Probe durch ein rotes Signal im Block angezeigt.

2.2.8 Zur Abfrage, wie lange es noch bis zum Ende des Laufs dauert, klicken Sie auf die Registerkarte **Check Status**. Der Laufname und die noch verbleibende Laufzeit werden angezeigt.

3. Auswertung der Daten und Interpretation der Ergebnisse

3.1 Zum Anzeigen der Ergebnisse wählen Sie die Registerkarte **View Results** in der Dx-Software.

3.2 Klicken Sie auf die Schaltfläche **View Another Run** am unteren Fensterrand, wählen Sie den Lauf, den Sie anzeigen lassen möchten, und klicken Sie auf **OK**.

3.3 Die Ergebnisse der Patientenproben (**Patient Results**) sollten bereits in der Liste **Views** (Ansichten) markiert sein. Die Patienten-/Proben-Kennung und das zugehörige Testergebnis werden übersichtlich dargestellt. Zur Interpretation der Ergebnisse dient die folgende Tabelle:

Ergebnis	Ergebnis Patientenprobe	Farbe	Interpretation	Weitere Maßnahme
1	Negative	Grün	Negativ für *Aspergillus*	Ergebnis als Report-Datei speichern oder drucken
2	Positive	Rot	Positiv für *Aspergillus*	Ergebnis als Report-Datei speichern oder drucken
3	Invalid	Hellgrau*	Amplifikation der IAC in der Probe fehlgeschlagen	Analyse der Probe wiederholen
4	Invalid	Hellgrau*	Fehlgeschlagene Reaktion bei Positiv- oder Negativkontrolle	Gesamten Lauf wiederholen

* Wenn als Ergebnis „ND" („nicht nachweisbar"; in Hellgrau) angezeigt wird, dann entspricht dies dem Fehlercode 3079, d. h. einer zu hohen Fluoreszenz in einem oder mehreren Kanälen. Wird ein Ct-Wert von <39,0 im *Aspergillus*-spezifischen Kanal registriert, so ist dies als positiver Befund anzusehen.

3.4 Um einzelne Probenergebnisse für *Aspergillus* oder die IAC separat anzuzeigen, wählen Sie **Sample Results** aus der Liste **Views** (Ansichten) und klicken Sie für jedes Target auf die betreffende Registerkarte. Die Ergebnisse werden im selben Format angezeigt wie die Ergebnisse der Patientenproben (**Patient Results**), allerdings getrennt nach den einzelnen Targets.

3.5 Falls bei einer Patientenprobe „Invalid" als Ergebnis ausgegeben wird, ist dies auf eine fehlgeschlagene IAC-Amplifikation zurückzuführen (wird durch „Unresolved" (= ungeklärt) in der Registerkarte **Sample Results** angezeigt). Wiederholen Sie die Reaktion (inklusive Positiv- und Negativkontrolle). Schlägt die Reaktion erneut fehl, könnte ein PCR-Inhibitor in der Template-DNA-Lösung vorhanden sein und ein negatives Analyseergebnis kann nicht als zuverlässig angesehen werden.

3.6 Sie können die Laufdaten folgendermaßen auf einen anderen Computer übertragen. Gehen Sie in das **Tools**-Verzeichnis am oberen Bildschirmrand und wählen Sie aus dem Drop-down-Menü zunächst **Data Management**, anschließend die Funktion **Archive Run(s)**. Ein Fenster mit einer Meldung wird angezeigt; klicken Sie auf **Proceed**. Wählen Sie den Lauf, den Sie speichern möchten, indem Sie im Kästchen links ein Häkchen setzen und klicken Sie auf **OK**. Eine Warnmeldung erscheint, die angibt, wie viele Läufe gespeichert werden sollen. Wenn die Anzahl korrekt ist, klicken Sie auf **Proceed**. Wählen Sie den Zielort für die Speicherung der Laufdaten, z. B. einen USB-Speicher-Stick. Klicken Sie auf **Save** und notieren Sie sich den Dateinamen. Eine Meldung erscheint, die angibt, wie viele Läufe gespeichert werden sollen. Wenn die Anzahl korrekt ist, klicken Sie auf **Proceed**.

3.7 Um Laufdaten zu importieren, gehen Sie folgendermaßen vor: Gehen Sie in das **Tools**-Verzeichnis am oberen Bildschirmrand und wählen Sie aus dem Drop-down-Menü zunächst **Data Management**, anschließend die Funktion **Retrieve Run(s)**. Ein Fenster mit einer Meldung wird angezeigt; klicken Sie auf **Proceed**. Gehen Sie auf **Look In:** und wählen Sie das Speichermedium, auf dem Laufdaten archiviert sind (siehe auch Punkt 3.4). Wählen Sie die Datei mit den Laufdaten, die übertragen werden sollen, und klicken Sie auf **Open**. Ein weiteres Dialogfenster öffnet sich, in dem Sie aufgefordert werden, den Lauf auszuwählen, auf den Sie zugreifen möchten. Wählen Sie die Datei mit den Laufdaten, die übertragen werden sollen und klicken Sie auf **OK**. Eine Meldung erscheint, die angibt, wie viele Läufe übertragen werden sollen. Wenn die Anzahl korrekt ist, klicken Sie auf **Proceed**.

3.8 Falls darüber hinaus ein Ausdruck der Testergebnisse erforderlich ist, klicken Sie auf **Report** und dann auf **Print**.

4. Hinweise zur Fehlersuche

4.1 **Die Negativkontrolle ergab ein positives Signal im FAM-Kanal:**

- Beim Ansetzen kam es zu einer Kontamination. Die Ergebnisse des gesamten Analysenlaufs können nicht als zuverlässig angesehen werden.

→ Wiederholen Sie den gesamten Lauf; gehen Sie dabei mit besonderer Sorgfalt vor, wenn Sie die Templates – vor allem die Positivkontrolle (Röhrchen 4) – zugeben, um sicherzustellen, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination kommt.

→ Vergewissern Sie sich, dass der Arbeitsbereich sowie Geräte und Hilfsmittel vor und nach Gebrauch auf korrekte Art und Weise dekontaminiert werden.

- Die Negativkontrolle befand sich nicht an der richtigen Position im Gerät.

→ Achten Sie darauf, dass die Reaktionsgefäße in die für sie vorgesehenen Positionen gestellt werden.

4.2 **Der Ct-Wert der IAC in der Negativkontrolle liegt außerhalb des akzeptablen Bereichs:**

- Die PCR wurde inhibiert.

→ Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsfläche sowie Geräte und Hilfsmittel nach der Anwendung von Dekontaminationslösungen und vor dem PCR-Setup völlig trocken sind.

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.

→ Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.

- Entweder wurde das Reagenz aus Röhrchen 1 oder 2 nicht zur PCR-Reaktion gegeben oder die doppelte Menge des Reagenzes aus Röhrchen 2 wurde pipettiert.

→ Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem höheren oder niedrigeren Flüssigkeitsstand in einem der Reaktionsgefäße – im Vergleich zu den anderen Gefäßen – erkennen.

4.3 **Die Positivkontrolle ergibt ein negatives Ergebnis:**

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.

→ Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.

- Es kam zu einem Fehler bei Schritt 1.12, und die Template-DNA der Positivkontrolle (Röhrchen 4) wurde in das falsche Reaktionsgefäß pipettiert.

→ Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem höheren Flüssigkeitsstand in einem Reaktionsgefäß und einem niedrigeren Flüssigkeitsstand in einem anderen Gefäß – im Vergleich zu den übrigen Gefäßen – erkennen.

- Das Reagenz aus Röhrchen 1 oder aus Röhrchen 2 wurde nicht zur Reaktion pipettiert.

→ Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem niedrigeren Flüssigkeitsstand in diesem Reaktionsansatz – im Vergleich zu den anderen Gefäßen – erkennen.

- Die Positivkontrolle befand sich nicht an der richtigen Position im Gerät.

→ Achten Sie darauf, dass die Reaktionsgefäße in die für sie vorgesehenen Positionen gestellt werden.

4.4 **Patientenproben ergeben Ergebnis „3“ – „Invalid“:**

- Wahrscheinlich enthält die aus der klinischen Probe extrahierte DNA PCR-Inhibitoren.

→ Zur optimalen DNA-Extraktion folgen Sie dem modifizierten Verfahren des manuellen High Pure DNA-Extraktionskits von Roche und nicht den Anweisungen des Herstellers.

→ Manche Blutentnahmeröhrchen für Serum enthalten möglicherweise PCR-Inhibitoren, die nicht geprüft wurden.

4.5 **In keinem Kanal wird ein Ergebnis erhalten – weder bei einer Probe noch bei den Kontrollen:**

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.

→ Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.

- Das verwendete Gerät arbeitet nicht optimal.

→ Überprüfen Sie bitte, dass Ihr Real-Time-PCR-Gerät über eine regelmäßig aktualisierte Wartungs-Historie verfügt und vollständig kalibriert wurde, so wie dies in der zugehörigen Installations- und Wartungsanleitung beschrieben ist.

- Beim Software-Setup wurde die falsche Protokolldatei verwendet.

→ Beachten Sie die Angaben in Abschnitt 2 und wählen Sie von der Myconostica Protokoll-CD-ROM die korrekte Protokolldatei, die für die betreffende Software in der jeweiligen Version angegeben wird. Nur die Datei, die der installierten Software entspricht, kann geladen werden. Wiederholen Sie den Lauf mit der richtigen Protokolldatei.

Wenn Sie weitere Fragen haben oder Hilfe bei Problemen benötigen, setzen Sie sich bitte mit unserem Technischen Kundendienst (mycotech@myconostica.co.uk) in Verbindung.

Leistungsmerkmale und Anwendungsgrenzen

Analytische Sensitivität

Unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls und der bei Myconostica hergestellten PCR-Templates wurde als Grenzwert der Leerprobe („Limit of Blank“, LoB) für den MycAssay™ Aspergillus-Test ein Ct-Wert von 39,0 bestimmt; die Nachweisgrenze („Limit of Detection“, LoD) lag – ausgehend von einer Serumprobe – bei < 5 Genom-Äquivalenten. Dies wurde mithilfe genomischer DNA aus dem Stamm AF293 von *Aspergillus fumigates* bestimmt, mit der Serum nicht-infizierter Personen dotiert wurde. Das Genom des Stamms AF293 wurde vollständig sequenziert und es ist bekannt, dass innerhalb des Genoms 37 Kopien der Zielsequenz, die mittels optischem Mapping bestimmt wurden, vorhanden sind.[8].

Analytische Spezifität

In den Validierungsstudien wurde die analytische Spezifität ursprünglich für die Verwendung mit Proben aus dem Respirationstrakt bestimmt. Dies wurde nicht wiederholt.

Die analytische Spezifität wurde mit DNA-Proben untersucht, die aus 15 verschiedenen *Aspergillus*-Spezies – darunter verschiedene Stämme von *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* und *A. nidulans* – extrahiert worden waren. Signalstärken oberhalb des LoB-Werts wurden als positives Ergebnis erfasst.

Für alle 15 getesteten *Aspergillus*-Spezies wurde in diesem Assay ein positives Ergebnis erhalten. Zusätzlich zu den zuvor erwähnten Spezies gilt dies auch für *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, *A. sclerotiorum*, *A. niveus*, *A. lentulus*, *A. unguis*, *A. candidus*, *A. wentii*, *A. tubingensis* und *A. foetidus*.

Auch genomische DNA, die aus *Penicillium* spp. extrahiert wurde, ergab positive Ergebnisse. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Sequenzen der molekularen Targets zwischen *Aspergillus* und *Penicillium* hoch konserviert sind. Es ist daher zu beachten, dass ein mit diesem Test erhaltenes positives Ergebnis auch das Ergebnis einer Infektion mit *Penicillium*, und nicht mit *Aspergillus*, sein könnte.

Analytische Selektivität

Die analytische Selektivität wurde mit DNA-Proben untersucht, die aus einer Fülle verschiedener Pilz- und Nicht-Pilz-Spezies extrahiert worden waren. Die folgenden Spezies wurden bei der ursprünglichen Validierung für Proben aus dem Respirationstrakt getestet und ergaben kein positives Ergebnis:
Alternaria alternata, *Blastomyces capitatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cladosporium spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Doratomyces microsporus*, *Fusarium solani*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhodotonila rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*,

[8] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature: 438: 1151-6.

Sporothrix schenkii, *Trichosporon capitatum*. Auch für die folgenden Bakterienspezies wurde kein positives Ergebnis erhalten: *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*.

Folgende Spezies wurden aufgrund ihrer potentiellen Anwesenheit im Serum getestet und ergaben kein positives Ergebnis:
Acinetobacter baumannii, Aeromonas hydrophilia, Burkholderia cepacia, Citrobacter koseri, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecium, Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Salmonela enterica, Serratia marcescens, Stenotrophmonas maltophila.

Humane genomische DNA ergibt in diesem Assay ebenfalls kein positives Ergebnis.

Interferierende Substanzen (Gegenanzeigen für die Anwendung)

Die folgenden Substanzen wurden in klinisch relevanten Konzentrationen getestet; für keine von ihnen wurde eine Inhibition des Assays festgestellt: Acetylcystein, Amphotericin, Beclometason-Dipropionat, Budesonid, Natrium-Colistimethat, Fluticasonpropionat, Formoterolfumarat-Dihydrat, Ipratropiumbromid, Lidocain, Mannitol, Salbutamolsulfat, Salmeterol, Natriumchlorid, Natrium-Cromoglicat, Terbutalin, Tobramycin.

Folgende Substanzen wurden aufgrund ihrer potentiellen Anwesenheit im Serum getestet. Es wurden klinisch relevante Konzentrationen getestet; für keine von ihnen wurde eine Inhibition der PCR-Reaktion festgestellt.
Amoxicillin mit Clavulansäure, Atovaquon, Azathioprin, Aztreonam, Ceftazidim, Ciproflaxicin, Chlorphenaminmaleat, Clindamycin-Phosphat, Cotrimoxazol, Creatinin, Dapson, Dexamethason-Natriumphosphat, Fluconazol, Meropenam, Metoclopramid-Hydrochlorid, Paracetamol, Primaquin-Phosphat, Prednison-Natriumphosphat, Prednison, Prochlorperazin, Vancomycin und Voriconazol

Bei folgenden Substanzen wurde eine inhibierende Wirkung auf PCR-Reaktionen festgestellt: Cefuroxim, Heparin, Methylprednisolon-Natriumsuccinat, Transaminase und Harnstoff. Wenn diese inhibierenden Substanzen in klinisch relevanten Konzentrationen zu Serum, das *Aspergillus*-DNA enthielt, hinzugefügt und mit dem modifizierten High Pure DNA-Extraktionskit extrahiert wurden, war keine Inhibition zu beobachten. Transaminase führt jedoch offenbar vor der Extraktion zu einem Abbau der *Aspergillus*-DNA, da 25 % der Wiederholproben negativ auf *Aspergillus* waren.

Klinische Befundung

HINWEIS: Stellen Sie beim Durchsehen des Ergebnisberichts sicher, dass das richtige Protokoll verwendet wurde. Bei Serumproben muss **SERUM MycAssay Asp v1** verwendet werden. Die Verwendung des falschen Protokolls führt zu ungültigen Ergebnissen.

Der MycAssay™ Aspergillus-Kit ist als diagnostisches Hilfsmittel vorgesehen. Die Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Patienten und den Ergebnissen weiterer diagnostischer Tests bewertet werden.

Nachfolgend werden Empfehlungen für Befundungen angegeben, wobei jede einzelne von der Interpretation der Assay-Ergebnisse abhängt.

Ergebnis-Ziffer „1“
„*Aspergillus* spp. nicht nachgewiesen.“

Ergebnis-Ziffer „2“
„*Aspergillus* spp. nachgewiesen. Positives Ergebnis. Mit diesem Assay wird auch *Penicillium* spp. nachgewiesen.“

Ergebnis-Ziffer „3“
„Test fehlgeschlagen. Anwesenheit von Inhibitoren oder anderen unbekannten Substanzen.“

Grenzen des Verfahrens

- Die Grenzen des Verfahrens hängen in erster Linie von der Qualität der Primärprobe ab:
    - Ist der Gehalt an *Aspergillus*-DNA im Blut niedrig, kann sich die Extraktionseffizienz auf das Ergebnis auswirken und der Test ein falsch-negatives Resultat ergeben.
    - Vorläufige Daten weisen darauf hin, dass sich das Einfrieren und die Lagerung von Serumproben auf die Menge der für den Assay brauchbaren DNA auswirken kann.
    - Zur Stabilität von *Aspergillus*-DNA in unverarbeitetem Vollblut oder Serum liegen keine Daten vor. Es wird daher empfohlen, Proben möglichst bald nach der Entnahme zu verarbeiten.
    - Es liegen keine Daten zur Leistung bei Serum vor, das in andere Blutentnahmeröhrchen als die empfohlenen Greiner Serumröhrchen (rote Kappe) entnommen wurde.
    - Es liegen keine Daten zu den Leistungsmerkmalen des Assays vor, wenn dieser mit aus Plasma oder Vollblut extrahierter *Aspergillus*-DNA durchgeführt wird.

- Falsch-positive Ergebnisse sind möglich, wenn es sich beim infizierenden Erreger um *Penicillium* spp. handelt, der mit diesem Kit nicht von *Aspergillus* spp. differenziert werden kann.

- Obwohl durch das High Pure DNA-Extraktionsverfahren möglicherweise PCR-Inhibitoren entfernt werden, sind nicht alle Medikamente oder Patientenpopulationen daraufhin evaluiert worden.

- In analytischen Validierungsstudien wurde festgestellt, dass Transaminase bei 22,2 U/0,5 ml Serum zu einem Abbau der *Aspergillus*-DNA vor der Extraktion geführt haben könnte.

- Bei der Validierung wurden Proteinase-K-Chargen bezogen und verwendet, bei denen anschließend eine Verunreinigung (an der Quelle) mit *Aspergillus* festgestellt wurde. Gehen Sie beim Erwerb aller Materialien mit Bedacht vor und nutzen Sie, wenn möglich, empfohlene Bezugsquellen.

- Von außen eingetragene Kontaminationen der Originalprobe oder der Kit-Reagenzien können zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Derartige Kontaminationen können durch mit *Aspergillus* verunreinigte Luft, unsaubere experimentelle Arbeitstechnik beim Umgang mit der Positivkontrolle oder durch eine äußerliche Kontamination (insbesondere von Pipettierhilfen) mit *Aspergillus*-DNA verursacht werden.

- Da ein richtig-positives Ergebnis bei Proben von Patienten, die vorübergehend oder dauerhaft mit *Aspergillus* spp. kolonisiert sind, erhalten werden kann, ist bei der Interpretation der Testergebnisse eine klinische Beurteilung im Zusammenhang mit der Erkrankung notwendig.

LIZENZIERUNG

TopTaq™ Hot Start wird von QIAGEN bezogen. QIAGEN® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland).

Dieses Produkt wird unter der Lizenz des Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, USA, verkauft und darf gemäß den PHRI-Patentrechten nur für die humane *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

SmartCycler® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Cepheid (904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, USA).

High Pure® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Deutschland.

Dieses Produkt ist zum Teil durch eine exklusiv gewährte Lizenz einer Patentanmeldung des Fred Hutchinson Cancer Centers in Seattle (USA) abgedeckt.

IVD

Myconostica Limited, South Court, Sharston Road, Sharston, Manchester, M22 4SN, Großbritannien.
Telefon: +44 (0) 161 998 7239 Fax: +44 (0) 161 902 2496
E-Mail: mycotech@myconostica.co.uk

CE